

GENE SYNTHESIS AND APPLICATIONS

基因合成及其应用

王美岭 韩金祥 编著

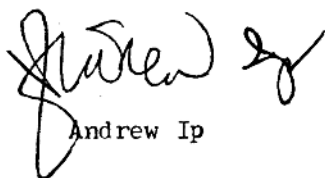


山东大学出版社

序

所有生命形式的构件始于他们的DNA序列，为这一遗传基础层次有一清晰的概念，我们需要熟悉其各种应用原则以及各种现有的实验仪器和技术。

王美岭教授编著的这本书为此目的给我们提供了该领域一个完整的框架，同时这也是合成、纯化以及向生物载体内插入寡聚核苷酸的一本实验指南。中国分子生物学专业工作者应感谢王教授将此复杂的课题提炼成一本启迪专著，从而便于我们系统而轻松地把握生命的意义。



Andrew Ip

1990年10月

目 录

第一章 绪论.....	1
第一节 基因的发展简史.....	1
第二节 基因的化学组成.....	3
第二章 DNA的生物合成	9
第一节 DNA生物合成过程	9
一、DNA生物合成的基本机制	9
二、DNA生物合成的一般过程	11
第二节 DNA生物合成有关酶类	16
一、DNA聚合酶	16
二、DNA连接酶	20
三、解开DNA双螺旋的酶和蛋白质	20
第三节 DNA生物合成的调控	24
第三章 RNA的生物合成	29
第一节 RNA聚合酶	29
第二节 RNA的生物合成过程	30
一、转录的起始.....	30
二、RNA链的延伸	32
三、转录的终止.....	33
第三节 RNA转录后的调节	35
一、RNA的拼接	36
二、5'一端帽子结构.....	39
三、3'一端多聚腺苷酸化.....	40
第四节 RNA复制	41
第四章 基因的人工合成原理.....	44
第一节 化学合成原理.....	45
一、一般原理.....	45
二、磷酸二酯合成法.....	45
三、磷酸三酯合成法.....	48
四、亚磷酸三酯合成法.....	54
五、固相合成法.....	55
第二节 酶促合成原理.....	57
一、DNA的酶促合成	57
二、RNA的酶促合成	61

第五章 DNA化学合成	67
第一节 DNA合成常用的保护基	67
第二节 DNA液相合成法	69
一、液相磷酸二酯合成法	69
二、液相磷酸三酯法	76
第三节 DNA固相合成法	80
一、固相合成常用的载体	81
二、固相磷酸三酯法	82
三、固相亚磷酸三酯法	88
第六章 DNA自动化合成	93
第一节 391A DNA合成仪的化学原理	93
一、固相载体—CPG	95
二、DNA合成的化学循环	96
三、合成后处理	102
第二节 DNA合成仪装置	106
一、DNA合成仪的控制系统	107
二、液气路系统	108
三、DNA合成仪的功能	111
第三节 DNA合成仪的操作	119
一、合成实验前的准备	119
二、亚磷酸胺化合物溶液的准备	119
三、试剂瓶的安装	121
四、DNA合成开始	121
五、DNA 切落和去保护基	123
六、其他	124
第四节 391DNA合成仪程序指令说明	127
一、DNA编序指令	129
二、DNA 合成开始指令	132
三、DNA 合成状态指令	133
四、换瓶指令	139
五、循环编排指令	141
六、手工控制指令	143
七、部分收集脉冲指令	144
八、程序编排指令	144
九、功能编排指令	145
十、自检指令	145
十一、断电指令	146

十二、定时指令.....	146
十三、停机指令.....	147
第七章 DNA的酶促合成	148
第一节 DNA片段的连接—T ₄ DNA连接酶.....	148
一、DNA的粘接和平头连接.....	148
二、质粒和DNA片段的连接.....	149
第二节 从真核mRNA制备cDNA插入片段.....	151
第三节 用DNA聚合酶合成DNA.....	157
第八章 RNA合成	158
第一节 RNA化学合成	158
第二节 RNA酶促合成	163
一、用T ₄ RNA连接酶的合成	163
二、用多核苷酸磷酸化酶(PNase)的合成.....	165
三、用核糖核酸酶(RNase)合成.....	165
第九章 PCR技术.....	168
第一节 PCR基本原理.....	168
第二节 PCR DNA聚合酶	169
第三节 PCR实验设计.....	172
一、标准反应体系.....	173
二、引物设计.....	173
三、PCR缓冲液	174
四、循环参数.....	174
五、扩增平台期.....	175
六、影响特异性的因素.....	176
第四节 PCR自动化.....	176
第五节 简单、快速地准备PCR样品.....	179
一、样品制备.....	180
二、样品提取方案.....	181
第六节 PCR方法研究进展.....	183
一、点突变.....	183
二、等位基因特异性寡聚探针.....	183
三、不对称PCR.....	184
四、复合PCR.....	184
五、倒转PCR.....	184
六、诱变作用.....	184
第七节 RCR扩增试剂盒.....	185
第十章 合成基因片段的分析和纯化技术.....	190

第一节 粗产物中DNA含量测定	190
第二节 电泳技术	191
一、电泳的基本原理	191
二、影响泳动率的因素	192
三、凝胶电泳的基本技术	194
四、聚丙烯酰胺凝胶电泳	195
五、琼脂糖凝胶电泳	208
第三节 层析技术	212
一、离子交换层析	212
二、高效液相色谱	220
第四节 寡聚核苷酸纯化柱 (OPC)	225
第十一章 DNA合成技术在分子生物学中的应用	228
第一节 基因的克隆和分离	228
一、杂交探针的合成	228
二、合成大片段探针	229
三、合成引物	230
四、DNA重组及克隆载体的构造	233
第二节 基因结构与功能关系的研究	237
一、转录启动子	237
二、操纵基因	241
三、核糖体结合位点的研究	242
四、tRNA和2'—5'寡聚腺苷酸的结构与功能	249
第三节 基因结构的研究	253
第四节 PCR技术在分子生物学中的应用	254
一、定序克隆	254
二、序列分析	255
第十二章 DNA合成技术在基因工程中的应用	258
第一节 全合成和半合成基因	258
第二节 基因的表达	267
一、启动子mT ₀ 的合成及对IFN—2A基因的 高效表达	267
二、合成酵母基因上游活性序列在高效表达 中的应用	268
第三节 基因的定位突变和蛋白质工程	269
第十三章 基因合成技术在医学中的应用	274
第一节 DNA探针用于临床诊断	274
第二节 PCR技术应用于临床诊断	274

一、遗传病的诊断.....	274
二、传染病的诊断.....	275
三、肿瘤的诊断.....	276
第三节 PCR 技术应用于法医鉴定	276
第四节 基因片段应用于临床治疗.....	277

附录

一、常用数据.....	279
二、核酸的单位及有关数据.....	279
三、几种生物基因组的大小.....	280
四、培养基和抗菌素.....	280
五、微量取样工具.....	283
六、核酸的保存技术.....	283
七、常用质粒载体.....	285
八、常用缓冲液和溶液的配制.....	287
九、常用电泳缓冲液的制备.....	290
十、常用凝胶加样缓冲液的制备.....	291
十一、聚丙烯酰胺凝胶的技术数据.....	292
十二、琼脂糖凝胶的技术数据.....	293
十三、各种凝胶所允许的最大操作表.....	294
十四、基因合成及其基因工程主要仪器及设备.....	295

第一章 绪 论

第一节 基因的发展简史

基因是英文gene的音译,指存在于细胞内有自体繁殖能力的遗传单位,这种单位在染色体上占有一定位置而作直线排列,现代遗传学研究表明,基因是具有特定的核苷酸顺序的核酸(多数为脱氧核糖核酸)分子中一个片段,是携有特定遗传信息的功能单位,基因的发现可以追溯到一个世纪以前,1868年,瑞士青年科学家Friedrich Miescher(1844—1895)到德国Tubingen,在F. Hoppe-Seyler的实验室研究细胞核的化学成分,他以实验室附近的外科医院收集到的伤员的绷带为材料,把浓细胞从绷带上洗下来,先用胃酶混合液消化这些浓细胞,再用乙醚提取,细胞核留在水相,沉在器皿底部,可用过滤的方法收集。从这样得到的细胞中,他提取得到一类化合物,呈酸性,不溶于稀酸,但能溶于稀碱,而且含有相当量的磷元素,这一点引起了Miescher的重视,因为在当时从动物组织中得到的含磷化合物只有磷脂一种,也是该实验室的研究者发现的,Miescher把他新发现的化合物命名为“核质”(Nuclein),并将他的实验结果写成论文送给导师Hopper-seyler审阅。为了慎重起见Hopper-Seyler没有马上发表,而亲自重复了Miescher的实验,得到同样的结果后,Hopper-Seyler才把Miescher的论文和他自己重复的结果在他所主编的Medizinisch-chemische Untersuchungen杂志上发表。当时Miescher年仅28岁,Miescher发现的“核质”实际是含有蛋白质的核酸制品。二十年以后,R. Altmann才制得不含蛋白质的核酸,并首先用“核酸”命名他的制品。自此以后,核酸的组成成分引起了许多著名化学家的兴趣,他们应用各种方法分解核酸分子,并从中分离得到嘌呤碱、嘧啶碱、核糖和脱氧核糖等。其中贡献最大的是A. Kossel和他的学生们,以及P. A. Levene和他的同事。Kossel等发现了除鸟嘌呤(J. Piccard发现)外核酸中常见的其他四种碱基,即腺嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶。Levene等则对核糖、 α -脱氧核糖、核苷和核苷酸的鉴定等作出了贡献。

但是核酸的结构、功能以及在生物体内起的作用,直到本世纪初仍然一无所知,甚至从事核酸化学组成研究了几十年的Kossel也认为核酸没有多大的重要性,因而于1905年改行研究细胞核中的碱性蛋白质。不久第一次世界大战爆发,当时世界核酸研究中心的德国是参战的主要一方,核酸的研究当然受到影响而停顿下来了。

本世纪二十年代,核酸的主要来源是胸腺和酵母,从胸腺得到的核酸含胸腺嘧啶,从酵母制得的核酸则不含胸腺嘧啶而含尿嘧啶,其他三种碱基,即腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶,则两者都有。另外还有一个差别,就是从胸腺核酸得到又—脱氧核糖,而酵母核酸则含有核糖。限于当时的技术水平,从其他动物组织制得的核酸都类似胸腺核酸,而从麦胚这样的植物来源的则和酵母核酸相同。因此一度以为核酸可以分为动物核酸和植物核酸两大类。随着技术水平的提高,研究发现无论在动物或植物细胞核内部都可以找

到胸腺核苷类型的核酸，而在细胞质内部含有象酵母那样的核酸。于是不再有动植物之分，而出现了核糖核酸（RNA含核糖）和脱氧核糖核酸（DNA含脱氧核糖）这样的分类，这种分类方法一直沿用到现在。

第二次世界大战结束的前夕，一个划时代的工作发表了。它对核酸的重要功能做了最直接的阐明，震动了近四十多年来深入广泛的研究，使核酸研究成为生物化学和分子生物学领域内最引人注目的一个分支。那就是1944年O.T.Avery等在研究肺炎球菌的转化现象时，发现从一种类型的肺炎球菌制备得到的DNA可以引到另一类型的肺炎球菌体内，并使后者的遗传性状改变成前者。由此他们得出DNA是遗传物质的结论，但由于当时流行的观点：蛋白质（而不是核酸）是遗传的物质基础，Avery等的实验结果曾一度被怀疑，认为他们的DNA制剂内杂有蛋白质。然而，Avery等的工作以令人信服的证据证明，DNA而不是蛋白质才是遗传物质，改变了当时的流行看法，从此核酸的研究进入了一个新的时代。1953年核酸研究又出现了一个重要的里程碑，这就是J.D.Watson和F.H.Crick的DNA双螺旋结构学说，这个学说不但阐明了DNA的结构，并为一个DNA分子如何复制成两个相同结构的DNA分子以及DNA怎样传递生物体的遗传性状提供了合理的说明。这项工作为现代分子生物学的奠基起到了关键性的作用，受到了科学界的普遍重视，两位科学家也因此而获得1962年诺贝尔奖。

从1955年以来，核酸研究发展之快，涉及范围之广，影响之大，内容之丰富，在生物科学领域内是罕见的，王德宝总结为十四个方面：

(1) 核酸的生物合成，包括DNA的复制，DNA转录成RNA和转录后的加工以及RNA反转录成DNA等。

(2) DNA不仅存在于细胞核内，而且在核外的细胞器中也找到，如真核生物的线粒体、叶绿体、原核生物的质粒等。RNA病毒和噬菌体，DNA病毒和噬菌体的发现。

(3) RNA和蛋白质生物合成的关系，tRNA, mRNA和rRNA的发现，三联密码的确定，蛋白质生物合成的过程等。

(4) 核酸的新陈代谢，嘌呤和嘧啶核苷酸的生物合成。

(5) 重要核酸工具酶的相继发现如核酸酶，聚合酶，限制性内切酶和连接酶等。

(6) 核酸分子中核苷酸排列顺序（一级结构）的测定。

(7) 核酸高级结构的测定。

(8) 基因表达和调节控制的机理。

(9) 真核生物DNA和RNA与原核生物DNA和RNA的差异，真核生物结构基因的不连续性，剪接现象的发现等。

(10) 修饰核苷酸和具有重要生物功能小分子活性核苷酸的发现。

(11) 不同核酸之间以及核酸和蛋白质之间的相互作用，核酸蛋白质复合体（如染色体、核糖体、复制体、病毒、噬菌体等）结构的研究。

(12) 细胞核内和其他小分子RNA的结构和特殊功能。

(13) 核酸的人工合成。

(14) 综合利用上述核酸研究的成就衍生出分子遗传学和基因工程，为医学、农

业、工业和环境保护等打开了新局面。

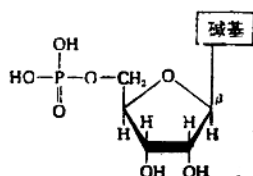
最近, Cech在研究RNA的剪接现象时, 发现了RNA也有催化活性, 命名为核酶 (ribozyme), 打破了酶为蛋白质的传统概念, Cech也因此荣获1989年诺贝尔奖。

我国的核酸研究到本世纪五十年代中期才开始, 研究的广度和深度与世界先进水平差距不少, 由于广大科技工作者的努力也取得了不少的成绩, 例如, 1981年我国科学家完成了酵母丙氨酸的tRNA的全合成工作, 这是世界上第一个人工合成的具有全部活性的RNA分子。

第二节 基因的化学组成

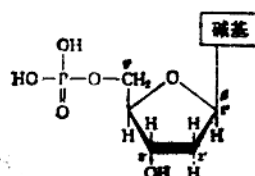
基因 (核酸) 的单体单位为核苷酸, 每种核苷酸含有三个特有的成份: (1) 一个含氮杂环碱基, 它们是嘧啶或嘌呤的一种衍生物。 (2) 一个戊糖。 (3) 一个分子磷酸 (图1—1)。

5'-磷酸核糖核苷



一般结构名称

5'-磷酸 2'-脱氧核糖核苷



一般结构名称

5'-磷酸腺苷 (腺苷酸; AMP)

5'-磷酸鸟苷 (鸟苷酸; GMP)

5'-磷酸胞苷 (胞苷酸; CMP)

5'-磷酸尿苷 (尿苷酸; UMP)

5'-磷酸脱氧腺苷 (脱氧腺苷酸; dAMP)

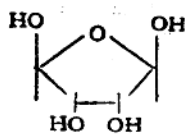
5'-磷酸脱氧鸟苷 (脱氧鸟苷酸; dGMP)

5'-磷酸脱氧胞苷 (脱氧胞苷酸; dCMP)

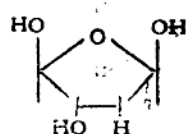
5'-磷酸脱氧胸苷 (脱氧胸苷酸; dTMP)

图 1—1 5'-磷酸核苷酸结构

DNA的单体单位为脱氧核糖核苷酸, 其中戊糖是D-2-脱氧核糖 (图1—2)。四种碱基为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶 (图1—3)。RNA的单体单位为核糖核苷酸, 其中戊糖是D-核糖 (图1—2)。四种碱基为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶 (图1—3)。



β -D-核糖



β -D-2-脱氧核糖

图1—2 戊糖结构

在核苷酸中两类杂环化合物嘧啶和嘌呤 (图1—3) 具有很明显的芳香族特性, 嘌呤

本身可以认为是嘧啶的一种衍生物，它是由一个嘧啶环和一个咪唑环耦合在一起组成的，在大多数细胞中，碱基只有少数是呈游离或不结合形式存在，而它们通常是酶水解核酸和核苷酸的产物。

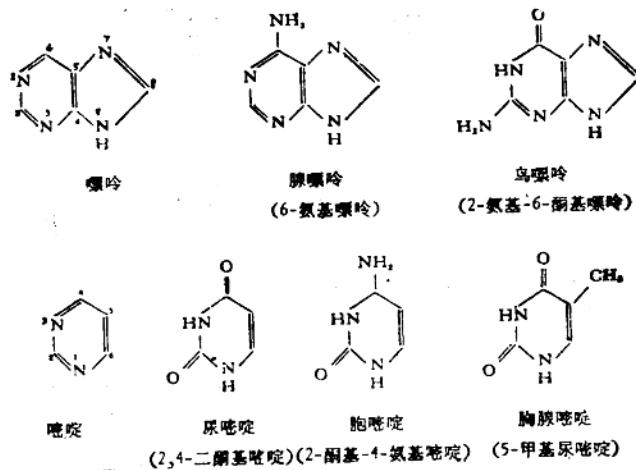
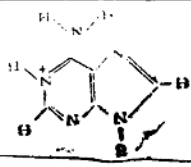
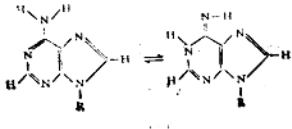
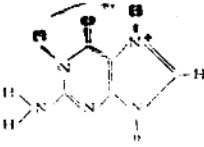
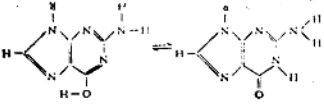
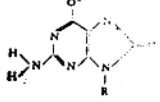
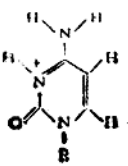
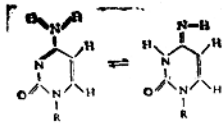
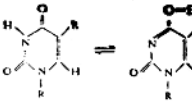
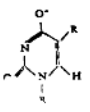


图1—3 碱基结构

表1—1 不同pH条件下核苷的解离态*

核 苷	pH2	pH7	pH12
腺苷或脱氧腺苷			
鸟苷或脱氧鸟苷			
胞苷或脱氧胞苷			
尿苷或脱氧胸苷			

*R为核糖或脱氧核糖；R'为H或CH₃。

嘧啶是平面分子，嘌呤很近似于平面，而有轻微折叠，不仅碱基的大小而且它们产生氢键的能力都决定着核酸的生物学功能。与氢键形成有关的重要功能基团有腺嘌呤，鸟嘌呤和胞嘧啶的氨基，腺嘌呤和鸟嘌呤第1位置和胞嘧啶碱基第3位置上的环-NH-基团，以及嘧啶的第2位置和鸟嘌呤的第6位置上的强负电性的氧原子（图1—3）。

游离嘧啶和嘌呤碱基在水中是相对难溶解的，它们是弱碱性化合物，随PH不同能以两种或多种互变异构的形式存在（表1—1）。

在波长250—280nm区域内，核酸的所有嘌呤和嘧啶碱基都强烈地吸收紫外光，这一性质不仅在游离碱基，而且在核苷和核苷酸的检定和定量分析中很有用处，游离嘌呤和嘧啶碱基容易用层析或电泳法分离。

嘌呤碱基的第9氮原子或嘧啶碱基的第1氮原子与戊糖的第1碳原子形成 β -N糖苷键统称核苷。核苷有两类：按所含糖分类为D-核糖核苷类及2-脱氧-D-核糖的脱氧核苷类（图1—4）。同游离嘌呤和嘧啶一样，在大多数细胞中只存在微量的游离核苷它们是核苷酸的化学合成酶的水解产物，核苷比相应的游离碱基更容易溶于水，在不同PH下存在与碱基类似的互变异构，N—糖苷键对酸不稳定。

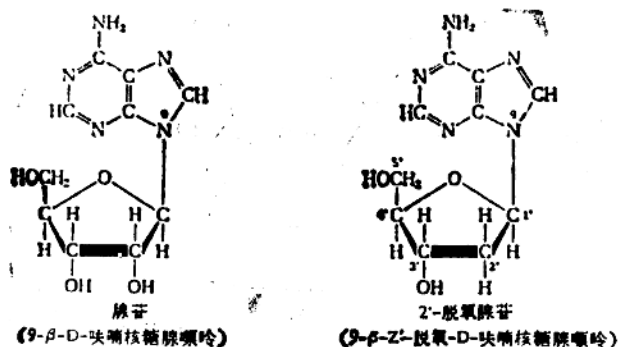


图1—4 腺嘌呤核苷

虽然理论上嘌呤或嘧啶环形成的N-糖苷键可自由转动，但事实上由于空间障碍限制其自由转动，在天然核苷中，反式(anti-form)构象较顺式(syn-form)更为合适（图1—5）。在DNA双螺旋中碱基配对也是以反式定位的，顺形式结构的书写方式仅是习惯上的方便。

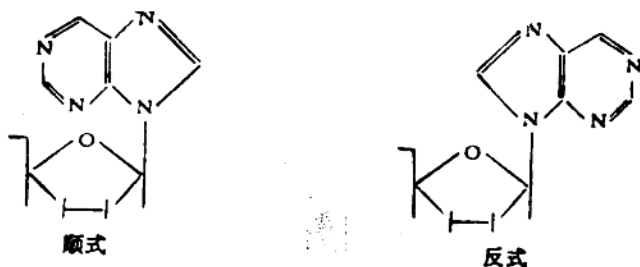


图1—5 核苷的顺反结构

核苷的磷酸酯叫核苷酸。核糖有三个游离羟基,所以核糖核苷酸有2',3'和5'核苷酸三种。脱氧核糖只有二个羟基可以酯化,故脱氧核糖核苷酸只有3'和5'核苷酸(图1—6)。

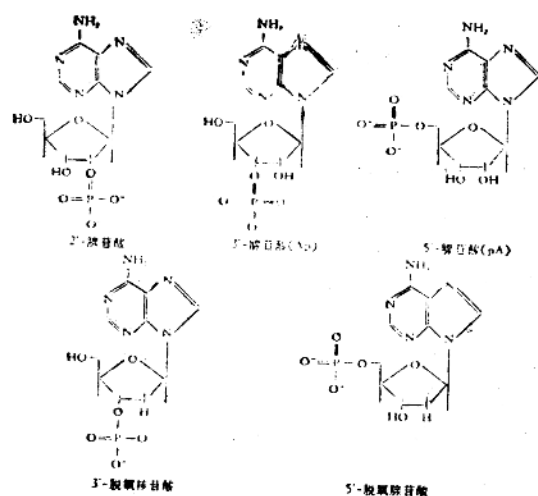


图1—6 腺嘌呤核苷酸

核酸分子是由核苷酸通过3'→5'磷酸二酯键连接而成的(图1—7)。

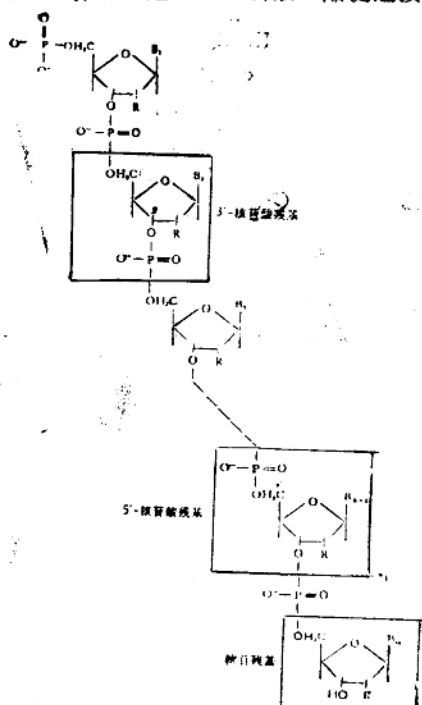


图1—7 核酸结构

$B_1, B_2, B_3, \dots, B_{n-1}, B_n$ 代表任一相同或不同的碱基,若R是OH则戊糖为核糖,若R是H则戊糖为脱氧核糖。

核酸是一个大分子化合物，为了书写方便，核酸及其衍生物一般多按国际纯粹化学和应用化学协会（IUPAC）和国际生化协会（IUB）所属生物化学专业术语委员会（CBN）批准的命名和缩写规则用缩写的方式表示，归纳如下：

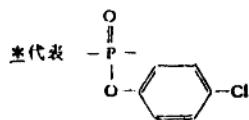
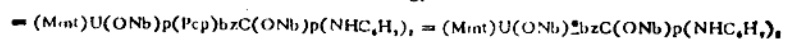
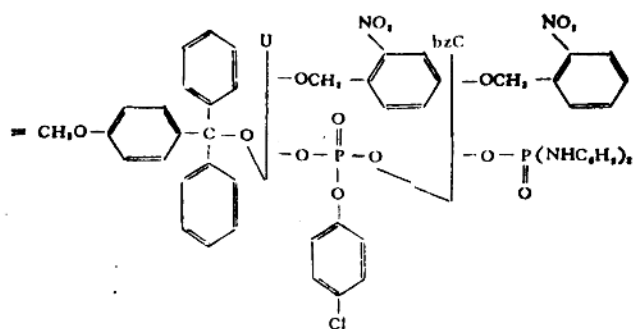
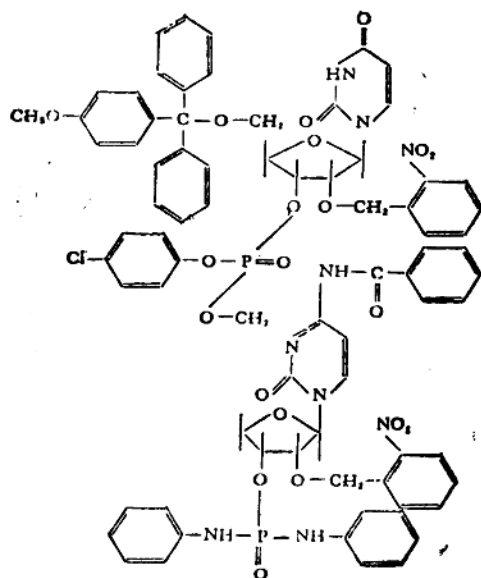
（1）碱基一般采用三字符号，即英文名称前三个字母，如腺嘌呤（adenine）为Ade，鸟嘌呤（guanine）为Gua，尿嘧啶（uracil）为Ura，胞嘧啶（cytosine）为Cyt，胸腺嘧啶（thymine）为Thy。

（2）核苷用单字符号表示，腺苷为A，鸟苷为G，胞苷为C，尿苷为U。脱氧核苷则在单字符号前加一小写字母d，如dA、dG、dC和dT分别代表脱氧腺苷，脱氧鸟苷，脱氧胞苷和脱氧胸苷。

（3）核苷酸的表示方法是在核苷符号的左方小写字母p表示5'-磷酸酯，右方代表3'-磷酸，如pA为5'-腺苷酸，Cp为3'-胞苷酸，依次类推。核苷多磷酸的表示法是：ppU代表5'-尿苷二磷酸，pppA为5'-腺苷三磷酸（即ATP）。ppGpp表示鸟苷四磷酸，其中二个磷酸根在鸟苷的5'位，另二个在3'位。2'-核苷酸无专一表示符号。2'，3'-环化核苷酸一般用>p表示如U>p代表2'，3'-环化尿苷酸，3'5'-环化核苷酸一般书写为cAMP、cGMP等。

（4）核酸链通常从5'端至3'端由左向右表示如：(5')pApGpC...pUp(3') 其中P在核苷的右下方代表3'连接，在左下方表示5'相连。为了简便，核酸链中的P通常被省略（末端的P不可省），或在核苷间加一小点或一短线，如(5')pAGC...UC(3')或(5')pA•G•C.....U•C(3')或(5')pA-G-C...U-C(3')，若2'-5'或5'-5'连接需要标明。

（5）在描述核酸的化学合成反应时，也常用缩写符号方式表示，例如5'-o单对甲氧三苯甲基-2'-o-邻硝基苄基-尿苷酰-P-对氯苄基-N-苯甲酰基-2'-o邻硝基苄基-胞苷-3'-磷酸二苯胺可有以下几种表示方法：



第二章 DNA的生物合成

DNA 是绝大多数生物遗传的物质基础,是生物体内最主要的信息分子。在细胞分裂过程中,亲代细胞所含的遗传信息源源本本地传递到二个子代细胞。这一过程实际上主要是DNA的复制过程或者称DNA的生物合成过程。本章重点讨论DNA生物合成的过程,生物合成所用的酶类以及调控等问题。

第一节 DNA生物合成过程

一、DNA生物合成的基本机制

1953年, Watson和Crick提出DNA的双螺旋结构模型时,精辟地推论DNA在生物体内是以半保留复制的方式合成的。因为在DNA双螺旋结构中,两条多核苷酸链的碱基互补,所以在DNA合成过程中,两条多核苷酸链之间的氢键断裂以后,每一条单链都可以作为模板合成与原来DNA完全相同的DNA分子。每个子代DNA的一条链来自亲代DNA,另一条链是新合成的互补链,以这种方式进行的复制合成称为半保留复制。1958年, Meselson和Stall设计了一个很巧妙的实验证明了上述推论是正确的。他们先将大肠杆菌放在纯度为96.5% $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 培养液中生长15代。使所有的DNA都被 ^{15}N 标记,然后再将细菌转移到已含有 $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ 的培养基中培养,随后在不同时间取出样品,每份样品都用SDS裂解细胞。将裂解液放在 CsCl 溶液中,以14000g离心20小时,离心结束,从管底到管口,密度由高到低形成梯度分布,DNA分子就停留在与其相当的 CsCl 密度处。在紫外光下可以看到一条吸收带。 ^{14}N -DNA分子密度约为 $1.71\text{g}/\text{cm}^3$,停留在距离离心管管口较近的位置。 ^{15}N -DNA密度较大,停留在离心管较低的位置。当含 ^{15}N -DNA的细胞在 $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ 培养基中培养一代以后,有一条区带介于 ^{14}N -DNA与 ^{15}N -DNA之间,这时在 ^{15}N -DNA区已没有吸收带。说明这时的DNA一条链来自 ^{15}N -DNA,另一条链来自 ^{14}N -DNA。培养二代以后,则在 ^{14}N -DNA区出现一个区带,随 $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ 培养时间增长, ^{14}N -DNA区带逐渐加强,而 ^{15}N -DNA区带逐渐减弱,但始终未出现新的区带(图2—1)。在理论上,DNA复制可能有三种情况(图2—2),一种是上述的半保留复制,另一种是二个子代DNA分子中一个分子完全是亲代的分子,而另一个分子完全是新合成的分子,这种方式称全保留复制。还有一种是亲代链被分解成很多片段,散布在新的子代分子中,这种方式称为散布式复制。在Meselson和Stall实验中,如果是全保留复制,那么 ^{15}N -DNA带不会随着在 $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ 培养基中培养而消失。如果是散布式复制,则在实验中仅会出现一条带,而不会出现两条带。只有按半保留复制形式进行才会出现上述实验结果。因此,这个实验有力地证明了Watson和Crick的推论。

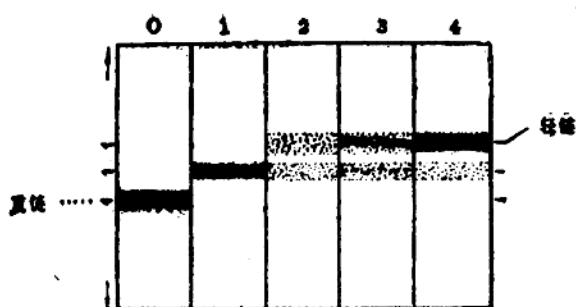


图2—1 Meselson和Stall实验结果

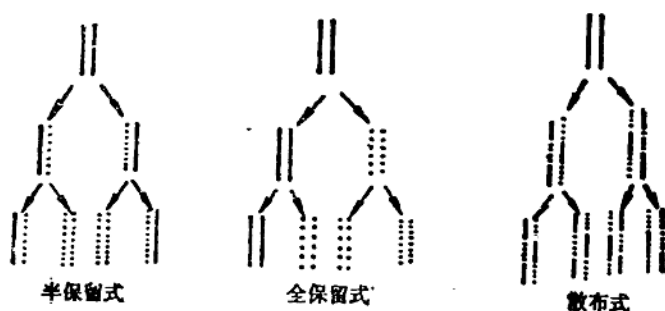


图2—2 DNA复制形式

1963年, Cairns将大肠杆菌在含 ^3H -TdR 培养液中生长两代左右, 用放射自显影方法观察整个复制中的染色体的形状变化, 发现大肠杆菌DNA复制时中间产物呈 θ 形(图2—3)。非复制部分银粒子密度较低, 按照半保留复制机理推论, 它是一条链被同位素标记。正在复制中的二条双链, 其中一条双链的二条链都被标记, 而另一条双链中仅一条链是标记的。因此形成 θ 形, 这就证明复制是以半保留方式进行的。

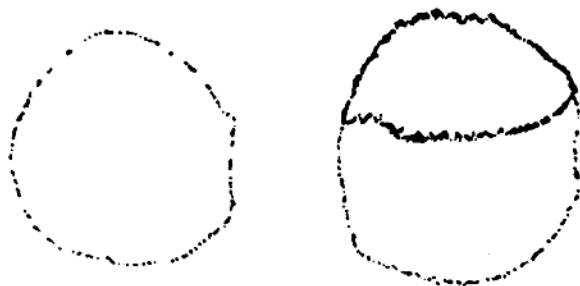


图2—3 复制中的大肠杆菌染色体放射自显影照片

1957年, Taylor将蚕豆苗放在含 ^3H -TdR溶液中生长, 8小时后所有DNA均被标记。再将蚕豆苗移入含秋水仙素的普通培养液中继续生长, 阻止纺锤体的形成。因此, 染